

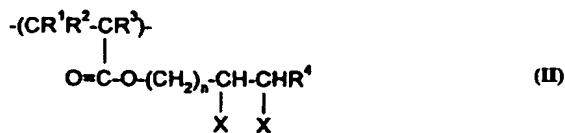
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C08F 291/08, 285/00, B01J 20/32</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/31549</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>10. Oktober 1996 (10.10.96)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/01278</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>7. April 1995 (07.04.95)</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: MÜLLER, Egbert [DE/DE]; Elbestrasse 70, D-64390 Erzhausen (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MACK, Margot [DE/DE]; Gartenstrasse 13, D-64689 Grasellenbach (DE). POGUNTKE, Peter [DE/DE]; Steingärten 23, D-64853 Otzberg 5 (DE). LUBDA, Dieter [DE/DE]; Im Bangert 21 c, D-64625 Bensheim (DE).			

(54) Title: DENDRIMERIC GRAFT POLYMERS

(54) Bezeichnung: DENDRIMERE PFROPFPOLYMERISATE



(57) Abstract

The invention concerns dendrimeric graft polymers based on base carriers containing hydroxyl groups and on the surfaces of which polymers are covalently bound, the following conditions applying: a) the base carrier contains aliphatic hydroxyl groups; b) the covalently bound polymers are bound by an end-position monomer unit to the basic carrier; c) the polymers at the branching points of the dendrimeric structure contain monomer units of formula (II); and d) the dendrimeric polymers contain monomer units of formula (III); R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> independently of one another stand for H or CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> stands for H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alkyl or C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> aryl, n is an integer between 1 and 5, one group X is OH and the other group X is an end-position monomer unit of a further polymer chain, and Y stands for a group containing a separation effector. The invention also concerns the production of these dendrimeric graft polymers and their use as separating agents for liquid chromatography.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft dendrimere Ppropfpolymerivate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, wobei a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält, b) die kovalent gebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind, c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel (II) enthalten, d) die dendrimeren Polymeren Monomereinheiten der Formel (III) enthalten, worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander H oder CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl, n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5, ein Rest X OH und der andere Rest Y eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette darstellt, und Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält, bedeuten. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser dendrimeren Ppropfpolymerivate und ihre Verwendung als Trennmaterialien für die Flüssigkeitschromatographie.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

### Dendrimere Ppropfpolymerisate

Die Erfindung betrifft dendrimere Ppropfpolymerisate und ihre Verwendung als Trennmaterialien für die Flüssigkeitschromatographie.

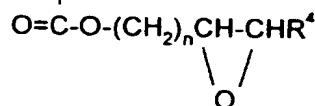
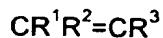
5

Aus DE 38 11 042 sind Trennmaterialien für die Chromatographie bekannt, die lineare Propfpolymere aufweisen. Diese Materialien weisen gegenüber Trennmaterialien, die vernetzte Polymere enthalten, deutliche Vorteile auf. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Trennmaterialien mit verbesserten Eigenschaften bereitzustellen.

10

Aus DE 43 10 964 sind oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien bekannt, bei denen Monomere der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger aufgepropft sind,

15



20

worin

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander

H oder CH<sub>3</sub>,

25 R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl  
und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5  
bedeuten.

30

Es wurde gefunden, daß sich diese aktivierte Trägermaterialien zu den erfindungsgemäßen Ppropfpolymerisaten mit dendrimerer Struktur umsetzen lassen. Dabei werden auf das bekannte Ppropfpolymerisat mit linearer Polymerkette (Polymerkette erster Generation) wiederum lineare Polymere aufgepropft (Polymerkette zweiter Generation), wobei dieser Schritt mehrfach wiederholt werden kann (Polymerketten höherer Generation).

35

So entstehen verzweigte Ppropfpolymerne, die jedoch keine Vernetzung aufweisen. Zusätzlich werden, entsprechend den vorgesehenen chromatographischen Trennverfahren, Separationseffektoren eingeführt. Die resultierenden Trennmaterialien weisen verbesserte Eigenschaften auf.

5

Die für die verschiedenen chromatographischen Trennungsverfahren notwendigen Separationseffektoren sind als feste Phase an einen Basisträger gebunden und gehen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Analyten der Probe ein. Für verschiedene chromatographische Trennungsmethoden sind dem Fachmann geeignete Separationseffektoren bekannt; beispielsweise: ionische oder ionenbildende (ionogene) Gruppen für die Ionenaustauschchromatographie, Affinitätsliganden für Affinitätschromatographie, wozu auch die Metallchelatchromatographie gehört, hydrophobe Gruppen für die hydrophobe Interaktionschromatographie oder reversed phase Chromatographie und vorwiegend netzartige poröse hydrophile Gruppen für die Gelpermeationschromatographie. Für die Abtrennung von niedermolekularen Analyten aus proteinhaltigen Matrices sind Materialien mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen bekannt, die entweder durch ihre Porenstruktur (US 4,544,485; EP 0 173 233) oder durch hydrophile Abschirmung (US 5,277,813) die unerwünschte Bindung der Proteine an die hydrophoben Bereiche vermeiden.

10

15

20

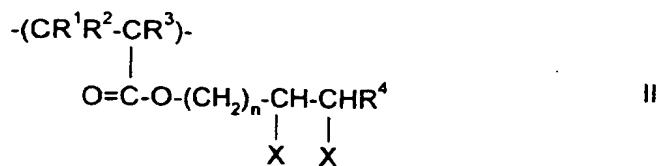
25

30

Gegenstand der Erfindung sind dendrimere Ppropfpolymerisate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, wobei

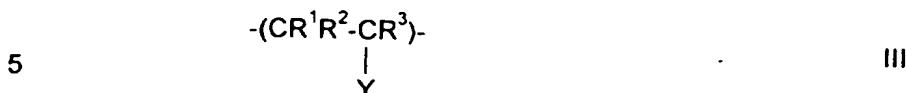
- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalent gebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten

35



- 3 -

d) und die dendrimeren Ppropfpolymerisate Monomereinheiten der Formel III enthalten,



worin

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinanderH oder CH<sub>3</sub>,10 R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

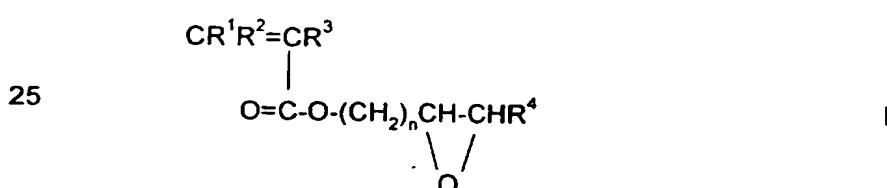
ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomer-  
einheit einer weiteren Polymerkette darstellt,

und

15 Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält,  
bedeuten.

Die erfindungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisate sind erhältlich  
durch folgende Reaktionsschritte:

20 a) Aufpropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppen-  
haltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



30 worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> und n die bereits genannten Bedeutungen  
besitzen;

35 b) zumindestens teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;  
 c) Aufpropfung von weiteren Monomeren, beispielsweise von weiteren  
Monomeren der Formel I, oder auch Monomeren, die Separations-  
effektoren enthalten, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen;

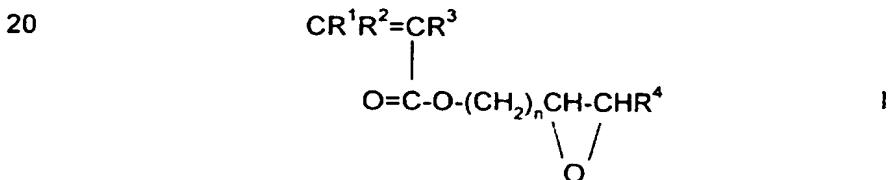
- 4 -

- d) optionale, auch mehrfache Wiederholung der Schritte b) und c);
- e) Einführung von Resten mit Separationseffektoren, soweit diese nicht bereits durch die Aufpropfreaktion mit Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, eingeführt sind;
- 5 f) optionale Ringöffnung verbliebener Oxirangruppen.

10 Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisaten bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie. Eine weitere erfindungsgemäße Verwendung ist die Abtrennung von niedermolekularen Analyten aus proteinhaltigen Matrices.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten mit folgenden Verfahrensschritten:

- a) Aufpropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



25

worin

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander  
H oder CH<sub>3</sub>,

R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl

30 und

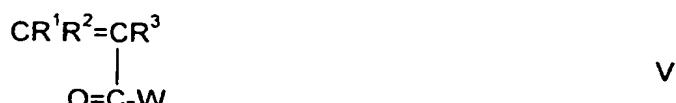
n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

bedeuten, wobei aus DE 43 10 964 bekannte aktivierte Trägermaterialien entstehen,

- 5 -

- b) zumindest teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;
- c) Aufpropfung von Monomeren der Formel I oder von Monomeren der Formel V auf die in Schritt b) entstandenen Diolgruppen in Gegenwart von Cer(IV)ionen.

5



10. **worin**

W OH oder NHR<sub>3</sub>

und

R<sup>8</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist

15

bedeuten.

wobei die Schritte b) und c) einmal oder auch mehrfach wiederholt werden können.

d) Einführung der Reste, die die Separationseffektoren enthalten, soweit diese nicht bereits durch die Aufpropfreaktion mit Monomeren der Formel V erfolgt ist

1

e) optionale Ringöffnung verbliebener Oxiranorgruppen

25

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch-, hydrophober Interaktions- oder Affinitätschromatographie,

unter Verwendung der erfindungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisaten. Weitere erfindungsgemäße Verfahren betreffen die Abtrennung von niedermolekularen Analyten aus proteinhaltigen Matrices mit Hilfe von erfindungsgemäßen dendrimeren Trennmaterialien.

Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit von Selektivität  $\alpha$  (Kurve A) und Bindungskapazität (Kurve B) von diethylamin-substituierten (DEA) Ionen-austauschern mit verschiedenem Verzweigungsgrad (Probennummer als Abzisse). Die experimentellen Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel A. Es zeigt sich, daß die Selektivität von verzweigtem Material deutlich höher ist als von unverzweigtem Material. Die Bindungskapazität nimmt, verglichen mit unverzweigten Vergleichsmaterial, bei geringer Verzweigung zu, fällt aber bei starker Verzweigung deutlich ab.

5

10 Die Abbildungen 2 und 3 zeigen den Versuchsaufbau für die Abtrennung von Analyten aus biologischen Matrices, beispielsweise Serum oder Plasma, unter Verwendung von erfundungsgemäßen Trennmaterien. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse eines Wiederfindungsversuchs unter Verwendung eines nach Beispiel 9 hergestellten Trennmaterials. Nähere 15 experimentelle Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel B.

20 Die erfundungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisate zeichnen sich durch eine baumartig verzweigte Struktur aus, wobei ein erstes lineares Polymer auf einen Basisträger, der aliphatische Hydroxylgruppen enthält, aufgeppropft ist. Dabei werden Monomere der Formel I, wobei die Reste R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub>, sowie n die bereits genannten Bedeutungen besitzen, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen aufgeppropft, wobei ein lineares Ppropfpolymerisat entsteht. Die Grundzüge dieser Reaktion sind von G. Mino und S. Kaizerman (1958) J. Polymer Science **31**, 242-243, und G. Mino et al. 25 (1959) J. Polymer Science **38**, 393-401, beschrieben. Das Polymer enthält zunächst Oxiranreste, die anschließend vollständig oder teilweise zu Diolgruppen umgesetzt werden. Dazu wird eine Behandlung mit verdunnter Schwefelsäure bevorzugt.

30 Auf die somit entstandenen aliphatischen Hydroxylgruppen dieses Polymers (erste Generation) können nun erneut Monomere der Formel I in Gegenwart von Cer-IV-Ionen aufpolymerisiert werden. Das resultierende Polymer (zweite Generation) ist in sich selbst linear. Die Gesamtstruktur ist jedoch verzweigt.

35

Um zu noch stärker verzweigten dendrimeren Ppropfpolymerisaten zu gelangen, können die genannten Arbeitsschritte wiederholt werden: Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen und Polymerisation von Monomeren der Formel I in Gegenwart von Cer-IV-Ionen.

5

Zusätzlich werden die für die chromatographischen Trennungen notwendigen Separationseffektoren eingeführt, die als feste Phase an einen Basisträger gebunden sind, und die unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Analyten der Probe eingehen. Für verschiedene chromatographische Trennungsmethoden sind dem Fachmann geeignete Separationseffektoren bekannt, beispielsweise:

15

- a) Für die Ionenaustauschchromatographie sind ionische Gruppen wie beispielsweise quaternäre Ammoniumalkylgruppen und die SO<sub>3</sub>-Gruppe, sowie ionogene Gruppen, die unter bestimmten pH-Bedingungen Ionen bilden, bekannt. Zu der letzten Gruppe gehören beispielsweise die alkylierten Aminogruppen, sowie die Carboxyl- und die Phosphorsäuregruppe.
- b) Für die Affinitätschromatographie sind dem Fachmann sehr viele Affinitätsliganden bekannt, die jeweils mit dem Analyten eine strukturell gegebene Bindung eingehen, und die als Separationseffektoren geeignet sind, beispielsweise:

**Tabelle 1:**

	<u>Affinitätsligand</u>	<u>Analyt (Beispiel)</u>
25	Protein A	Immunglobuline
	Concanavalin A	Glycoproteine
	Biotin	Avidin/Streptavidin
	Avidin	Biotin
	Streptavidin	Biotin
30	5'-Adenosinmonophosphat	NAD-abhängige Oxidoreduktasen
	2',5'-Adenosindiphosphat	NADP-abhängige Oxidoreduktasen
	Aminoacridin	RNA oder DNA

**Tabelle 1 (Fortsetzung):**

	<u>Affinitätsligand</u>	<u>Analyt (Beispiel)</u>
5	Boronsäure	Katecholamine
	Boronsäure	glykosyliertes Hämoglobin
	Iminodiessigsäure	Metalloproteine
	"thiophile" Liganden	Immunglobuline
	Cibachromblau	monoklonale Antikörper
	c)	Für die hydrophobe Interaktionschromatographie sind ungeladene hydrophobe Separationseffektoren üblich, beispielsweise C <sub>1</sub> -C <sub>20</sub> -Alkyl, C <sub>6</sub> -C <sub>25</sub> -Aryl, C <sub>7</sub> -C <sub>25</sub> -Alkylaryl oder C <sub>7</sub> -C <sub>25</sub> -Arylalkyl, die auch einfach oder mehrfach mit Nitril oder C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> -Alkoxy derivatisiert sein können, wobei auch eine oder mehrere nicht benachbarte CH <sub>2</sub> -Gruppen durch NH oder O oder auch eine oder mehrere CH-Gruppen durch N ersetzt sein können, oder Polyoxyethylen- oder Polyoxypropylenederivate [(CH <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> -O] <sub>o</sub> -R <sup>9</sup> , worin m 2 oder 3, o eine ganze Zahl zwischen 1 und 200 und R <sup>9</sup> H oder C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> -Alkyl bedeuten. Bevorzugt werden besonders Reste mit mittlerer oder geringer Hydrophobizität. Diese Reste können als Alkyl- oder Arylreste, als Alkoxy- oder Aroxyreste oder als Alkoyl- oder Aroylreste eingeführt werden.
10	d)	Für die Gelpermeationschromatographie werden hydrophile Verbindungen, die vorzugsweise Poren oder Netzwerke ausbilden, als Separationseffektor benutzt. Dazu gehören (Meth)acrylsäurederivate wie Acrylamid oder Methacrylamid, ferner (2,3-Dihydroxypropyl)-methacrylat oder N-(2-Methoxyethyl)acrylamid oder N-(2,3-Dihydroxypropyl)-acrylamid. Außerdem gehören dazu vinylierte Heterocyclen, wie z.B. 1-Vinylimidazol, N-Vinylpyrrolidon, 2-Vinylpyridin, 4-Vinylpyridin, 4-Vinylpyrrolidon-N-oxid.
	e)	Für die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen aus biologischen Proben (z.B. Urin oder Blut) werden sogenannte abgeschirmte Phasen verwendet. Diese Trennmaterialien weisen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche auf. Dabei treten die hydrophoben Bereiche, deren Struktur den oben (siehe c)) erwähnten hydrophoben Trennmaterialien entspricht, in Wechselwirkung mit den

5 niedermolekularen Analyten der Probe. Die hydrophilen Bereiche verhindern die Wechselwirkung der hochmolekularen Anteile der Probe (z.B. der Proteine) mit den hydrophoben Bereichen. Dendrimere Ppropfpolymerisate entsprechend der vorliegenden Erfindung eignen sich in hervorragender Weise als abgeschirmten Phasen für die Abtrennung von Analyten aus biologischen Matrices.

10 Zur Einführung der Separationseffektoren sind verschiedene Reaktionswege möglich:

10 a) Die Separationseffektoren werden durch Reaktion mit den den Oxiranresten, die nach der Polymerisation mit Verbindungen der Formel I vorhanden sind, in den Träger eingebaut; z.B.:

15 a1) die Reaktion mit schwefliger Säure oder ihren Salzen oder mit primären, sekundären oder tertiären Aminen, wobei Ionenaustauscher entstehen;

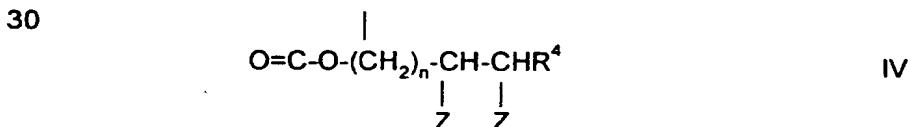
a2) die Reaktion mit Iminodiessigsäure oder die Einführung thiophiler Liganden, oder anderer Affinitätsliganden wie Protein A, wobei Träger für die Affinitätschromatographie entstehen;

a3) die Reaktion mit Alkoholen, Phenolen oder auch primären Aminen, wobei hydrophobe Trennmaterialien entstehen.

20

25 Hydrophobe Separationseffektoren lassen sich beispielsweise auch durch Esterbindungen an Hydroxylgruppen, wie sie durch Hydrolyse der Oxiranreste entstehen, einführen.

25 Bei der Reaktionsfolge nach a1) entstehen beispielsweise Verbindungen, bei denen der Rest Y aus Formel III die Bedeutung von Formel IV besitzt,



- 10 -

worin

R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

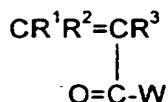
ein Rest Z OH und der andere Rest Z einen Rest, ausgewählt aus der  
5 Gruppe NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, N+R<sup>5</sup>R<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> und SO<sub>3</sub>H,

und

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> unabhängig voneinanderC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, wobei einer oder beide Reste R<sup>5</sup> oder R<sup>6</sup>  
auch H sein kann,

10 bedeuten.

b) Bei der letzten Ppropfpolymerisation können statt der Monomeren der Formel I die aus DE 38 11 042 bekannten Monomeren eingesetzt werden, wobei die aus dieser Druckschrift bekannten Gruppen als Separationseffektoren eingeführt werden. Dazu gehören beispielsweise Monomeren der Formel V,



V

20

worin

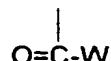
W OH oder NHR<sup>8</sup>

und

R<sup>8</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest  
25 substituiert ist,

bedeuten.

In den nach Verfahrensvariante b) hergestellten Trägermaterialien bedeutet  
30 der Rest Y aus Formel III einen Rest nach Formel VI,



VI

35

- 11 -

worin

W OH oder NHR<sup>8</sup>

und

R<sup>8</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-,

5 Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist,  
bedeuten.

Bevorzugte Monomere der Formel V sind solche, bei denen W eine der  
folgenden Bedeutungen besitzt: OH, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>,

10 NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NHC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H oder NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H.

Nachdem die beschriebenen Umsetzungen ausgeführt wurden, können  
gegebenenfalls noch verbliebene Oxiranreste hydrolysiert werden,  
beispielsweise durch eine abschließende Behandlung mit verdünnter

15 Schwefelsäure.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fach-  
mann die obige Beschreibung in weitesten Umfang nutzen kann. Die bevor-  
zugten Ausführungsformen sind deswegen lediglich als beschreibende,

20 keineswegs als in irgendeine Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten  
Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, insbesondere der  
deutschen Anmeldung P 43 34 351, eingereicht am 08.10.1993, sind durch  
25 Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

Die folgenden Beispiele sollen den Gegenstand näher erläutern; diese  
Beispiele stellen keine Einschränkung des Erfindungsgegenstandes dar.

30

**Beispiele****Herstellungsbeispiele**

5 In den folgenden Herstellungsbeispielen bedeutet Raumtemperatur (RT) 15-30 °C. Die Polymerisation wird in einem Dreihalskolben geeigneter Größe, der mit Rührer, Tropftrichter und Thermometer ausgerüstet ist, ausgeführt. Gewaschen wird durch Absaugen auf einer Glasfritte (G2).

10 **Beispiel 1: Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von Fractogel®-TSK HW 65 (S)**

15 Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Fractogel®-TSK HW 65 (S) und 66 ml Wasser werden mit 3 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO<sub>3</sub> (65 %)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt 20 zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

25 **Beispiel 2: Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von LiChrospher®-Diol**

30 Die Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel 1, LiChrospher®-DIOL (Partikelgröße 15-25 µm, Porengröße 80 nm) wird als Basisträger anstelle von Fractogel®-TSK HW 65 (S) verwendet.

**Beispiel 3: Aufpropfung eines Polymeren auf ein diolhaltiges Polymer (Erzeugung der dendrimeren Struktur)**

5      **Stufe 1:** Überführung der Oxiran- in Diolgruppen  
100 ml abgesaugtes oxiran-aktiviertem Trägermaterial hergestellt nach  
Beispiel 1 werden mit 200 ml 0,5 M Schwefelsäure (1 Stunde, 50 °C)  
hydrolysiert und somit die Oxirngruppen in Diolgruppen überführt. An-  
schließend wird dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

10     **Stufe 2:** Aufpropfen einer weiteren Polymerkette  
Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Material aus Stufe 1 und  
66 ml Wasser werden mit 3 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer  
Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO<sub>3</sub> (65 %)) bei Raumtemperatur  
unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer  
15     Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird  
eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zwei-  
mal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je  
200 ml Wasser gewaschen.

20     Es resultiert ein einfach verzweigtes dendrimäres Material mit Oxiranresten.

25     **Beispiel 4: Aufpropfung eines Polymeren auf ein diolhaltiges Polymer (Erzeugung von mehrfach verzweigten den- drimeren Strukturen)**

30     Das Material aus Beispiel 3 wird nochmals der in Beispiel 3 beschriebenen Reaktionsfolge unterworfen. Es entsteht ein zweifach verzweigtes den- drimäres Material mit Oxiranresten.

35     Dieses Material kann wiederum der in Beispiel 3 beschriebenen Reak- tionsfolge unterworfen werden. Dabei entstehen dendrimäre Materialien mit Oxiranresten und mit höhergradiger Verzweigung.

**Beispiel 5: Synthese eines mit Diethylamin substituierten dendrimeren Trennmaterials**

100 ml abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 3 (einfach verzweigt)  
5 werden in 100 ml Wasser suspendiert und 100 ml Diethylamin zugegeben.  
Anschließend wird 20 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach  
wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen.

Das gewaschene Reaktionsprodukt wird in 100 ml einer 0,5 M Schwefelsäurelösung suspendiert und zwei Stunden bei 40 °C langsam gerührt.  
10 Danach wird mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7) bis zum Neutralpunkt,  
anschließend mit Wasser gewaschen. Das Gel wird in wäßriger Suspension  
unter Zusatz von 0,02 % Natriumazid gelagert.

15 **Beispiel 6: Synthese eines mit Diethylamin substituierten, zweifach verzweigten dendrimeren Trennmaterials**

100 ml abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 4 (zweifach verzweigt)  
20 werden in wie in Beispiel 5 beschrieben mit Diethylamin umgesetzt.

In entsprechender Weise sind auch höher verzweigte mit Diethylamin substituierte dendrimere Trennmaterialien zugänglich.

25 **Beispiel 7: Herstellung eines Affinitätsträgers für die Metall-Chelat-Chromatographie**

30 Eine Lösung von 15 g NaOH und 25 g Iminodiessigsäure in 100 ml Wasser wird mit konzentrierter HCl auf pH 11 eingestellt und mit 1 g Aktivkohle entfärbt. Zu dieser Lösung werden 50 ml abgesaugtem oxiran-aktiviertem Trägermaterial hergestellt nach Beispiel 4 (zweifach verzweigt) gegeben.  
35 Die Lösung wird bei 45 °C 20 Stunden gerührt. Das Reaktionsprodukt wird abgenutscht, mit je 250 ml 0,5 M NaOH und mit Wasser gewaschen. Die nicht umgesetzten Oxirngruppen durch Behandlung mit 100 ml 0,5 M Schwefelsäure (2 Stunden, 45 °C) hydrolysiert.

- 15 -

Anschließend wird das Affinitätsträgermaterial einmal mit 100 ml 0,5 M Schwefelsäure, zweimal mit 100 ml Wasser, einmal mit 100 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7 und einmal mit 100 ml 1 M NaCl-Lösung gewaschen.  
Das Gel wird in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 1 M NaCl und 0,02 % NaN<sub>3</sub> gelagert.

**Beispiel 8: Herstellung eines sauren Ionenaustauschers**

10 Stufe 1:

100 ml Gel hergestellt nach Beispiel 3 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45 °C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

15 Stufe 2:

10 g NaOH werden in 200 ml Wasser gelöst und 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure zugefügt, bis der pH 4 beträgt (ca. 45 g; Monomerenlösung). Als Starterlösung für die Polymerisation werden 8,2 g Ammoniumcer(IV)nitrat in 50 ml 0,5 M Salpetersäure gelöst.

20

100 ml Gel aus Stufe 1 werden in der Monomerenlösung suspendiert und in einen Dreihalskolben gefüllt, die Starterlösung wird in den daran angeschlossenen Tropftrichter gefüllt. Die Apparatur wird dreimal evakuiert und mit Argon begast. Unter Rühren (150 UpM) wird nun die Starterlösung

25

zulaufen lassen und anschließend bei 40 °C vier Stunden weitergerührt.

Anschließend wird das Produkt mit 200 ml 1 M Natriumsulfit in 1 M Schwefelsäure, mit 1 l Wasser, mit 3 l 0,1 M NaOH, mit 500 ml 1 M Natriumacetatpuffer pH 7 und mit 500 ml Wasser gewaschen. Das Produkt wird in 20 mM Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 0,02 % NaN<sub>3</sub>

30

gelagert.

**Beispiel 9: Herstellung eines Trägermaterials für die Bestimmung von niedermolekularen Substanzen in biologischen Matrices**

5      **Stufe 1:** Herstellung eines Glycidyloxypropyl-Trägers  
10 g eines LiChrospher® Si 60, Partikelgröße 25 µm, mit einer spezifischen Oberfläche von 380 m<sup>2</sup>/g und einem mittleren Porendurchmesser von 9 nm (E. Merck, Darmstadt) werden in 50 ml Toluol suspendiert und nach Zugabe von 3,8 ml (4 mmol/m<sup>2</sup>) Glycidyloxypropyl-methyl-dimethoxysilan 5 Stunden unter Rühren am Rückfluß gekocht. Nach dem Absaugen des Materials wird es Toluol und Methanol nachgewaschen und getrocknet.

10     **Stufe 2:** Ringöffnung des Glycidyloxypropyl-Trägers zur Diol-Phase  
Das erhaltene Produkt aus Stufe 1, wird in 50 ml einer 5%igen Schwefelsäure-Lösung suspendiert und zur Öffnung des Epoxyrings 3 Stunden unter langsamen Rühren am Rückfluß gekocht. Nach dem Absaugen der Reaktionssuspension, wird mit Wasser sulfatfrei gewaschen und nach nochmaligem Auswaschen mit Methanol getrocknet. Man erhält einen Diol-Träger (Kohlenstoffgehalt 7,6 %; entsprechend 2,81 mmol/m<sup>2</sup> Diol-Gruppen).

15     **Stufe 3:** Erste Propfpolymerisation  
Zu einer Suspension aus 40 ml sedimentiertem LiChrospher®-Diol aus Stufe 2 und 60 ml Wasser werden mit 0,8 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 1,2 g HNO<sub>3</sub> (65 %)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 1,2 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 15 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit 200 ml Wasser gewaschen.

**Stufe 4: Schwefelsäurehydrolyse**

40 ml Gel aus Stufe 3 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45 °C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

5

**Stufe 5: Zweite Ppropfpolymerisation**

0,8 g Ammoniumcer(IV)nitrat werden in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 1,2 g HNO<sub>3</sub> (65 %) gelöst. Diese Lösung wird zu einer Suspension aus 40 ml sedimentiertem gepropftem LiChrospher®-Diol aus Stufe 4 und 60 ml Wasser bei Raumtemperatur unter starkem Rühren zugefügt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 1,2 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 15 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

15

**Stufe 6: Umsetzung des dendrimeren Ppropfpolymeren mit hydrophoben Liganden**

5 g des getrockneten Trägermaterials aus Stufe 5 werden bei 0 °C in trockenem Chloroform suspendiert. Zu dieser Lösung werden 60 ml getrocknetes Triethylamin zugegeben. Anschließend wird eine Lösung von 2 g Stearoylchlorid in 25 ml Chloroform, bei Kühlung auf 4 °C, innerhalb von 3 Stunden zugegeben.

25 Nach der Zugabe des Säurechlorids wird 48 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt und das Gel anschließend mit jeweils 50 ml Chloroform, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und getrocknet.

**Stufe 7: Schwefelsäurehydrolyse**

30 40 ml Gel aus Stufe 6 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45 °C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

35 Auf die vorbeschriebene Weise wird ein dendrimeres shielded phase Trennmaterial bereitgestellt, dessen hydrophobe Reste durch hydrophile Diolgruppierungen abgeschirmt sind.

Das folgende Anwendungsbeispiel zeigt den Einfluß des Verzweigungsgrades auf Bindungskapazität und Trennvermögen des Trennmaterials.

5      **Anwendungsbeispiel A: Einfluß des Verzweigungsgrades**

Einfach bis siebenfach verzweigte DEA-derivierte Trennmaterialien (Proben 2-7) werden entsprechend den Beispielen 5 und 6 hergestellt, unverzweigtes Vergleichsmaterial (Probe 1) wird in Analogie zu Beispiel 5 10 hergestellt, wobei statt des dendrimeren oxiranhaltigen Polymers das lineare Polymer aus Beispiel 1 benutzt wird.

Diese Trennmaterialien werden jeweils in eine SuperPerformance<sup>®</sup> Glassäule (50 x 10 mm) gefüllt und mit dem Auftragepuffer (50 mM TRIS-Puffer, 15 pH 8,3) äquilibriert. Eine Lösung von Rinderserumalbumin (10 mg/ml) in diesem Puffer wird kontinuierlich aufgetragen (Fluß: 0,5 ml/min) und das Elutionsdiagramm durch Photometrie bei 280 nm gemessen. Aus der Durchbruchskurve wird die Kapazität bestimmt. Das Trennverhalten für Rinderserumalbumin wird ebenfalls bestimmt und als Selektivitätsfaktor  $\alpha$  20 ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengestellt.

Es zeigt sich, daß die Selektivität  $\alpha$  (Kurve A) von verzweigtem Material deutlich höher ist als von unverzweigtem Material. Die Bindungskapazität (Kurve B) nimmt, verglichen mit unverzweigten Vergleichsmaterial, bei 25 geringer Verzweigung zu, fällt aber bei starker Verzweigung deutlich ab.

**Anwendungsbeispiel B: Wiederfindung von Carbamazepin in Plasma**

30      a) Apparatur

Fig. 2 zeigt den apparativen Aufbau, darin bedeuten:

1. Vorsäulen-Puffer	2. Analysen-Puffer
3. HPLC-Pumpe (L-6000)	4. HPLC-Pumpe (L-6200)
5. automatischer Probengeber (AS-4000)	
6. automatisches Umschaltventil (ELV-7000)	
7. Vorsäule	8. analytische Säule

9. Detektor 10. Integrator (D-2500)  
11. Abfallbehälter

5 In Fig. 3 sind die Leitungsverbindungen zwischen den Modulen in Abhängigkeit von der Stellung des Umschaltventils (6) dargestellt:  
Fig. 3a: Stellung "L" (LOAD)  
Fig. 3b: Stellung "I" (INJECT)

10 b) Chromatographische Bedingungen:  
Vorsäule ((8); 25 x 4 mm): Trennmaterial, hergestellt nach Beispiel 9;  
Vorsulen-Puffer (1): 0,05 M Na-Phosphat (pH 5,0); analytische Säule ((8);  
LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B, 5  $\mu$ m, 125 x 4 mm); Analysen-Puffer (2):  
0,05 M Na-Phosphat (pH 4,0)/Acetonitril (80:20; V:V); Detektion UV 210  
15 nm.

c) Analysenzyklus  
Nach Injektion der Plasmaprobe (100  $\mu$ l) durch den automatischen  
Probengeber (5) in Stellung "L" des Umschaltventils (6) gelangt die Probe  
20 mit Hilfe des durch die HPLC-Pumpe (3) geförderten Vorsulen-Puffers ((1);  
Flußrate 0,5 ml/min) auf die Vorsäule (7). Der Analyt (Carbamazepin) wird  
von dem Trennmaterial der Vorsäule selektiv retiniert, während Matrix-  
bestandteile, insbesondere Proteine, innerhalb von 12 Minuten in den  
Abfallbehälter (11) eluiert werden.

25 Nach Umschalten des Ventils (6) in Stellung "I" wird der Analyt mit Hilfe von  
der HPLC-Pumpe (4) geförderten Analysen-Puffers ((2); Flußrate 0,8  
ml/min) innerhalb von 5 Minuten vollständig von der Vorsäule (7) eluiert und  
auf die nachgeschaltete analytische Säule (8) transferiert.

30 Nach Umschalten des Ventils (6) in die Stellung "L" erfolgt die analytische  
Trennung unter isokratischen Bedingungen (Flußrate 0,8 ml/min). Die  
eluierten Verbindungen werden im Detektor (9) gemessen und im Integrator  
(10) ausgewertet. Gleichzeitig wird die Vorsäule mit Hilfe der HPLC-Pumpe  
35 (3) für einen neuen Analysenzyklus konditioniert.

- 20 -

d) Ergebnis

In Fig. 4 sind die Elutionsdiagramme für

A: einen Kalibrator, der 0,5 µg Carbamazepin enthält,  
und  
5 B: eine Plasmaprobe (Humanplasma), die ebenfalls 0,5 µg  
Carbamazepin enthält.

Wie ersichtlich, wird der Analyt in der Plasmaprobe vollständig wieder-  
gefunden.

10

15

20

25

30

35

## Ansprüche

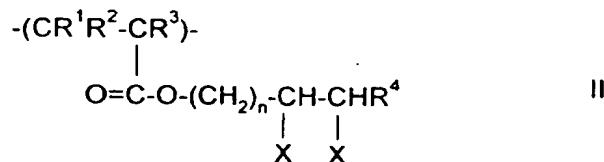
1. Dendrimere Ppropfpolymerivate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

5 a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,

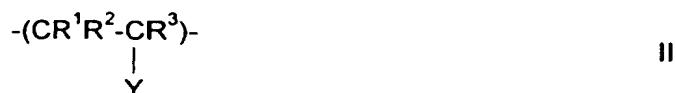
b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,

10 c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten

15



20



worin

25

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander  
H oder CH<sub>3</sub>,

R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

30

ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomer-  
einheit einer weiteren Polymerkette darstellt,  
und

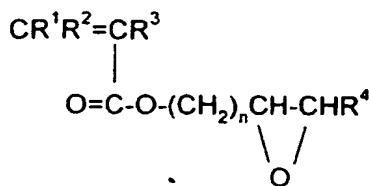
Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält,  
bedeuten.

2. Dendrimere Ppropfpolymerivate erhältlich durch folgende Reaktionsschritte:

a) Aufpropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,

5

10



worin

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup>, unabhängig voneinanderH oder CH<sub>3</sub>,

15

R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl

und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

bedeuten,

20

b) zumindestens teilweise Umsetzung der Oxirngruppen in Diolgruppen;

c) Aufpropfung von weiteren Monomeren, beispielsweise von weiteren Monomeren der Formel I, oder auch Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen;

d) optionale, auch mehrfache Wiederholung der Schritte b) und c);

25

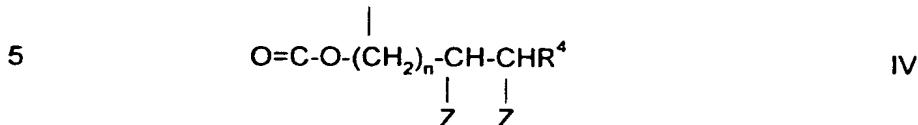
e) Einführung von Resten mit Separationseffektoren, soweit diese nicht bereits durch die Aufpropfreaktion mit Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, eingeführt sind;

f) optionale Ringöffnung verbliebener Oxirngruppen.

30

3. Dendrimere Ppropfpolymerivate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Separationseffektor einen ionischen oder ionogenen Rest enthält.

4. Dendrimere Ppropfpolymerisate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rest Y nach Formel IV enthalten ist,



worin

10  $\text{R}^4$  H,  $\text{C}_1\text{-C}_5$ -Alkyl oder  $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ -Aryl,  
 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,  
 ein Rest Z OH und der andere Rest Z einen Rest, ausgewählt aus der  
 Gruppe  $\text{NR}^5\text{R}^6$ ,  $\text{N}^+\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^7$ ,  $\text{PO}_4\text{H}_2$  und  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  
 und

15  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$  und  $\text{R}^7$  unabhängig voneinander  
 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -Alkyl, wobei einer oder beide Reste  $\text{R}^5$  oder  $\text{R}^6$   
 auch H sein kann,  
 bedeuten.

20 5. Dendrimere Ppropfpolymerisate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rest Y nach Formel VI enthalten ist,



worin

W OH oder  $\text{NHR}^8$

und

30  $\text{R}^8$   $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-,  
 Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder  
 Sulfonsäurerest substituiert ist,  
 bedeuten.

35 6. Dendrimere Ppropfpolymerisate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest Y einen Affinitätsliganden enthält.

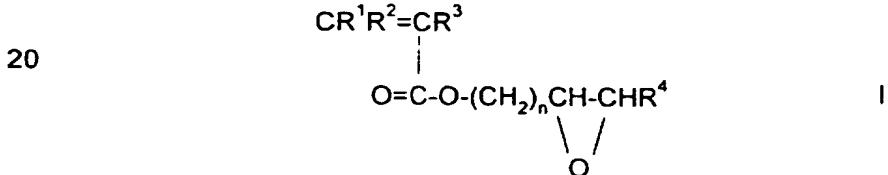
7. Dendrimere Ppropfpolymerisate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest Y einen hydrophoben Rest enthält.

5 8. Verwendung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten mit den Merkmalen von Anspruch 1 oder 2 bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch-, hydrophober Interaktions- oder Affinitätschromatographie.

10 9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei Analyte aus biologischen Matrices abgetrennt werden.

15 10. Verfahren zur Herstellung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

a) Aufpropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



25 worin

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander  
H oder CH<sub>3</sub>,

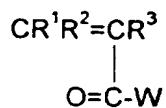
R<sup>4</sup> H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl  
und

30 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5  
bedeuten,

b) zumindest teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;

c) Aufpfpfung von Monomeren der Formel I oder von Monomeren der Formel V auf die in Schritt b) entstandenen Diolgruppen in Gegenwart von Cer(IV)ionen,

5



V

worin

10

W OH oder  $\text{NHR}^8$ 

und

15  $\text{R}^8$   $\text{C}_{1-10}\text{-Alkyl}$ , das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist,

15

bedeuten,

wobei die Schritte b) und c) einmal oder auch mehrfach wiederholt werden können,

und

20

d) Einführung der Reste, die die Separationseffektoren enthalten, soweit diese nicht bereits durch die Aufpfpfreaktion mit Monomeren der Formel V erfolgt ist.

25

11. Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch-, hydrophober Interaktions- oder Affinitätschromatographie, unter Verwendung von dendrimeren Pfpolymerisaten mit den Merkmalen von Anspruch 1 oder 2.

30

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei Analyte aus biologischen Matrices abgetrennt werden.

35

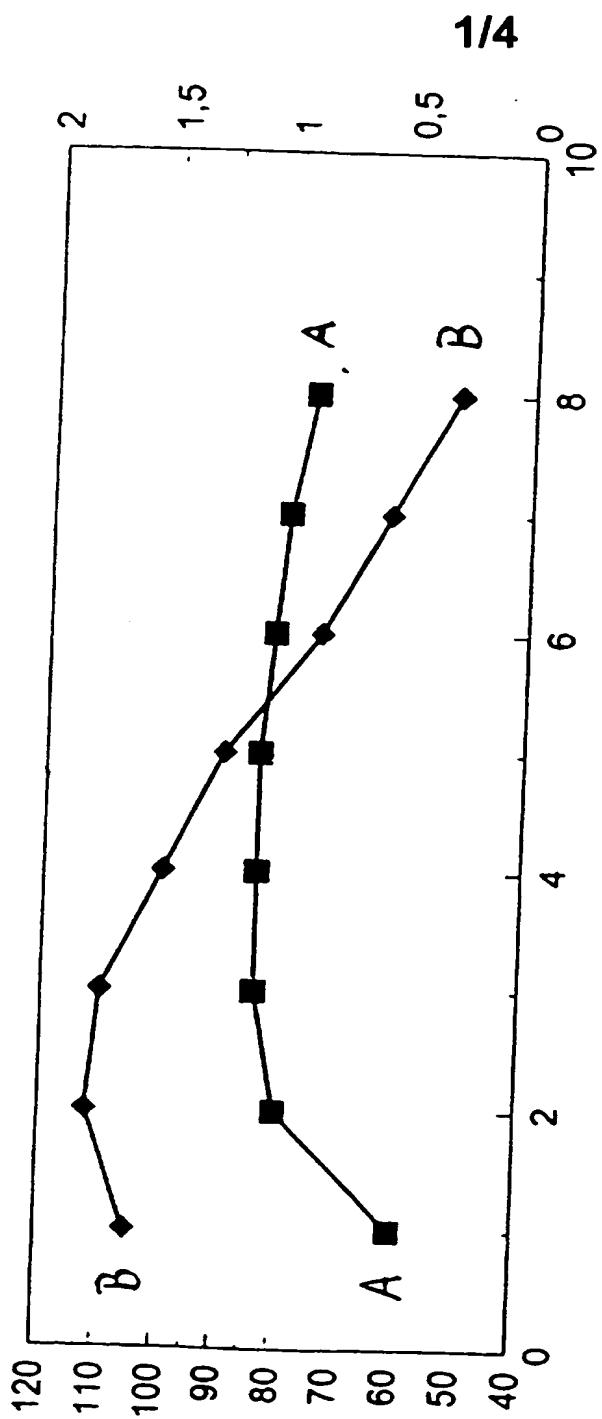
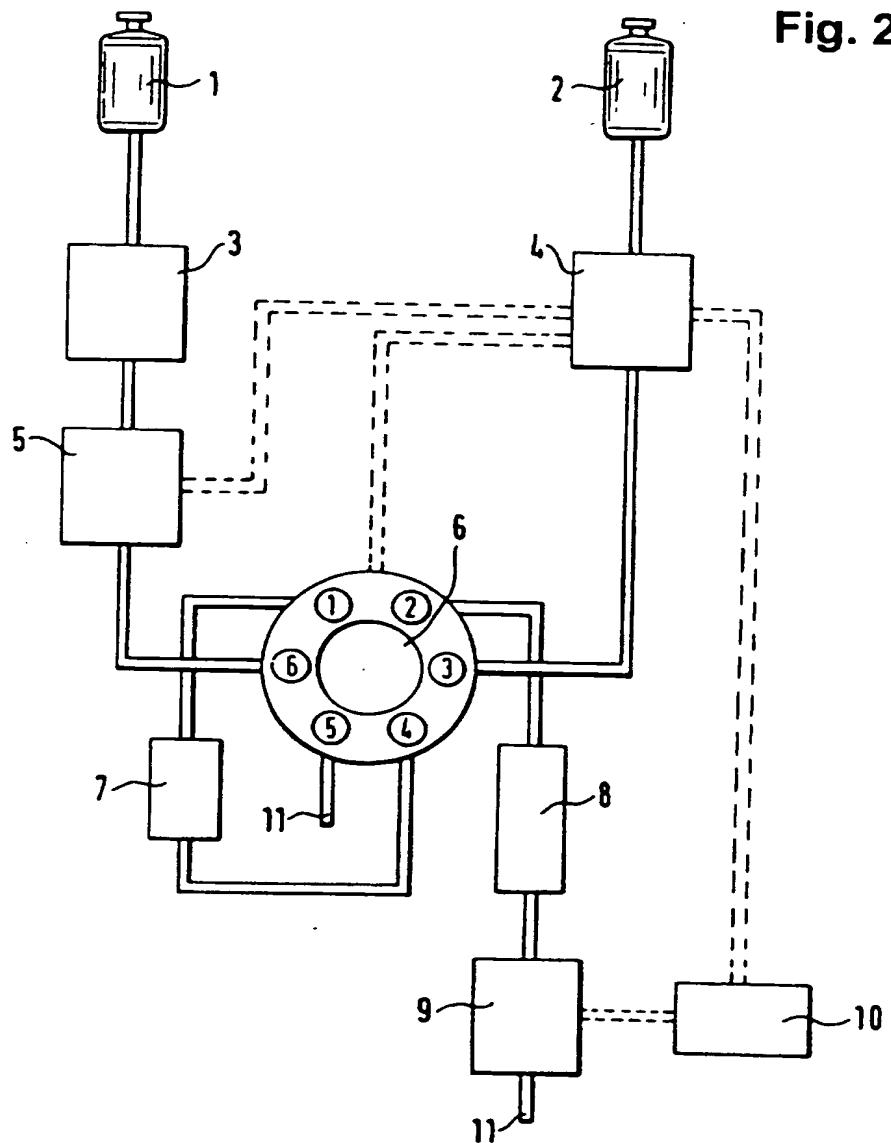


Fig. 1

2/4

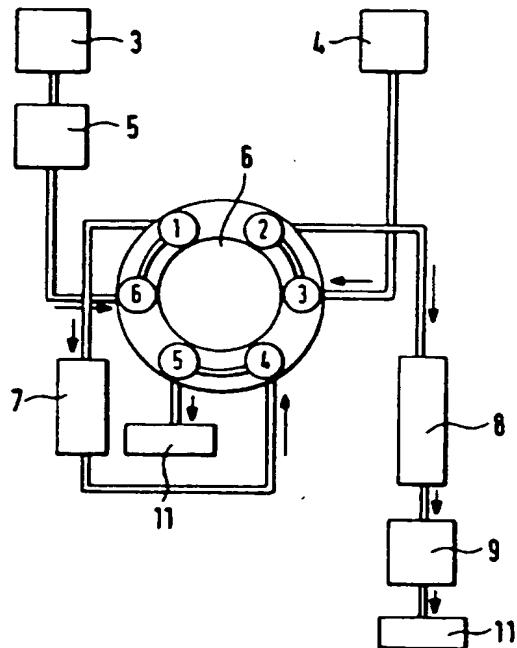
Fig. 2



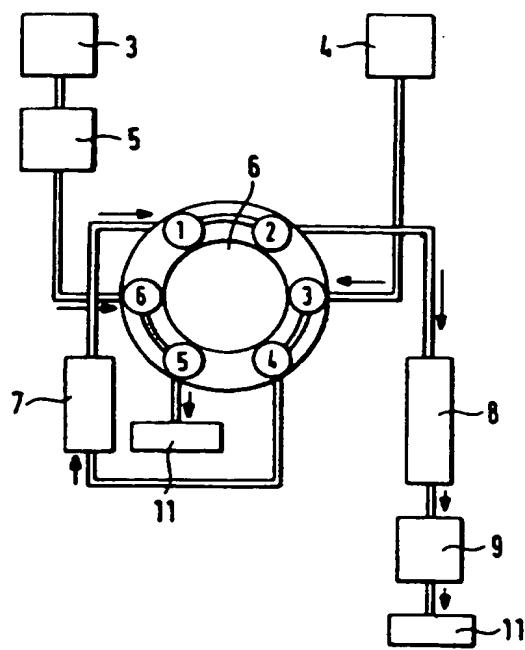
3/4

Fig. 3

A

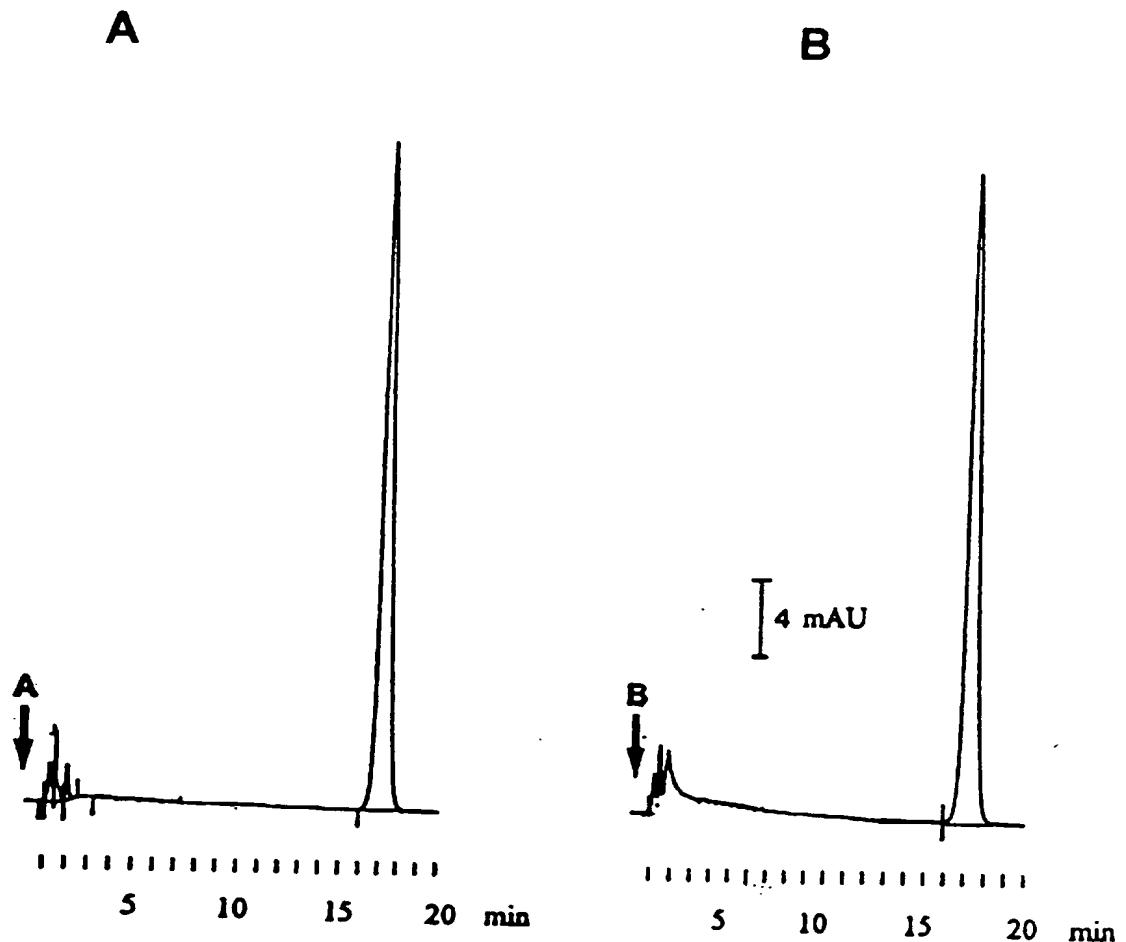


B



4/4

Fig. 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/EP 95/01278

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C08F291/08 C08F285/00 B01J20/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C08F B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 26379 (MERCK PATENT GMBH) 24 November 1994 see page 4, line 9 - page 5, line 23; example 2 -----	1-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*'E' earlier document but published on or after the international filing date
- \*'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 December 1995	15. 01. 96
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016	Meulemans, R

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 95/01278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9426379	24-11-94	DE-A- 4316136	17-11-94

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: des Aktenzeichen  
PCT/EP 95/01278

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C08F291/08 C08F285/00 B01J20/32

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C08F B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,94 26379 (MERCK PATENT GMBH) 24.November 1994 siehe Seite 4, Zeile 9 - Seite 5, Zeile 23; Beispiel 2 -----	1-12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*' A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*' E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*' L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*' O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*' P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*' T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*' X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundenischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*' Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundenischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*' & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20.Dezember 1995	15.01.96
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Meulemans, R

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interr. Aktenzeichen  
PCT/EP 95/01278

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9426379	24-11-94	DE-A- 4316136	17-11-94